Lane Medical Library
1926

Aus dem Bakteriologischen Institut
der Landwirtschaftskammer für die Provinz Westfalen
in Münster i. W.
Direktor: Dr. Sachweh.

Kritische Erörterungen über die Tuberkelbakterien-Anreicherungsverfahren im Vergleich zu der Einengungs-methode mit destilliertem Wasser.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der veterinär-medizinischen Fakultät
der Hessischen Ludwigs-Universität
Giessen.

★

Vorgelegt von Max Stiens
approb. Tierarzt in Nordkirchen i. Westf.

202

Gedruckt mit Genehmigung der
veterinär-medizinischen Fakultät
Gießen.
Referent: Professor Dr. Zwick.

Das Ostertagsche Tuberkulosebekämpfungsverfahren hat sich als praktisch durchführbar erwiesen. Wenn auch alle Anforderungen noch nicht erfüllt sind, und immerhin einiges noch zu wünschen übrig bleibt, so darf man dem Verfahren die Anerkennung nicht vorenthalten, daß es erfolgreich ist. Im Laufe der Zeiten hat es eine Reihe von Kritiken über sich ergehen lassen müssen, aber solange an Stelle der Kritik noch nichts besseres eingesetzt ist, solange wird man sich mit dem Verfahren abfinden und ihm zugestehen müssen, daß es seinen Zweck bei richtiger Durchführung erfüllen kann. Eine Reihe von Verbesserungen erwiesen sich nach dem Kriege bei der Wiedereinführung des Tuberkulosebekämpfungsverfahrens als zwingende Notwendigkeit; demgemäß sind auch Mängel, die dem Verfahren anhafteten, abgestellt worden; soviel läßt sich heute schon sagen, daß infolge der Abstellung dieser Mängel der ganze Weg einfacher und das Verfahren flüssiger geworden ist. Das ist ein wesentlicher Fortschritt, der sich mit der sich ständig mehrenden Zahl der Anschlüsse ganz erheblich erkennbar macht. Zur Diagnose der offenen Tuberkulose ist die exakte klinische Untersuchung, die gegründet sein muß auf eine genaue Kenntnis des recht verschieden verlaufenden Krankheitsbildes und auf ein gewisses Maß praktischer Erfahrung, Vorbedingung. Von letzterer sowohl als auch von der Gewissenhaftigkeit des Untersuchenden ist die Gewinnung einer für bakteriologische Zwecke brauchbaren Probe abhängig.

Zur bakteriologischen Diagnose steht der bakterioskopische Nachweis von Tuberkelbakterien und der Tierversuch, der bislang als sicherstes Diagnostikum offener Tuberkulose gilt, zur Verfügung.

Nachdem der Streit über die unblutige und blutige Methode der Materialgewinnung lange hin und her gewogt hat, mußte er zu Gunsten der letzteren entschieden werden; denn der Rachenschleimprobe haften, ganz abgesehen von den die Untersuchung sehr erschwerenden säurefesten Stäbchen, soviel Verunreinigungen an, daß schon durch die dauernde Verimpfung solcher Proben, bei der ständigen Zunahme der Anschlüsse die Durchführung des Verfahrens allein aus rein wirtschaftlichen Gründen unmöglich geworden wäre.

Die verschiedenartigen Färbemethoden, über die die Diagnostik mittlerweile schon verfügt, bedürfen kaum einer Abänderung, da in der Ziehl-Neelsen- und Spenglerfärbung Methoden gefunden worden sind, die die Untersuchungsergebnisse der Lungenschleimproben ausreichend sicherstellen. Die Frage kann hier durchaus vernachlässigt werden, ob etwa durch verfeinerte Färbemethoden bessere Ergebnisse zu erzielen sind; denn der Zweck dieser Arbeit liegt darin, nachzuweisen, ob durch die neuzeitliche Methode der Anreicherung die an sich schon hochwertigen Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung doch noch verbesserungsfähig wären.

Das spärliche Vorkommen der Tuberkelbakterien in den positiven Proben und der positive Ausfall des Tierversuches bei bakterioskopisch negativen Proben drängten dazu, nach Methoden zu forschen, die entweder die in den Proben enthaltenen Bakterien in eingeengter Form auf den Objektträger bringen konnten, oder die diese durch Zusatz irgend welcher Nährsubstanzen unter günstigen Temperaturverhältnissen zur Vermehrung zu bringen vermochten, d. h. „Eine Anreicherung auf biologischer Grundlage zu vollziehen“ (Eisenberg). (1)

Kritische Uebersicht über die Anreicherungsverfahren.

a) Die älteren Methoden.

Von Jochmann (2) wurde zuerst der Vorschlag einer Anreicherung mit Heyden-Glyzerinbouillon gemacht. Die mit der Flüssigkeit versetzte Probe sollte bei einer Temperatur von 37° bebrütet werden. Das Verfahren bewährte sich selbtverständlich indessen nicht, ist aber später in modifizierter Form wieder aufgegriffen worden. Die Anreicherungsversuche stehen an Zahl weit zurück gegenüber denen, die eine Einengung bewirken sollten. Es hatte nämlich bald jeder Autor erkannt, daß die Frage der Anreicherung fiel mit der langsamen Wachstumtendenz der Tuberkelbakterien, die durch die mehr oder weniger große Beimengung von Begleitbakterien nicht gerade gefördert wurde. An erster Stelle steht hier das Biedert'sche Verfahren (2). Hierbei wird das mit der 2- bis 4fachen Menge einer 0.2prozentigen Natriumhydratlösung versetzte Sputum in ein mit Gummistopfen zu verschließendes Gefäß gefüllt und bis zur Homogenisierung des Materials kräftig geschüttelt, nötigenfalls noch etwas Natriumhydratlösung nachgefüllt. Dann wird das Gemisch in einer Porzellanschale

bis zum Sieden erhitzt, worauf man es in einem Spitzglase absetzen lassen kann oder es nach Versetzen mit der doppelten Menge 90prozentigen Alkohols zentrifugiert.

Das Verfahren hat man heute auch nach den Abänderungen von Nebel, Stroschein, Spengler, Nemser etc. aufgegeben.

Lange und Nitsche (2) haben ein sinnreisches Verfahren zur Einengung der Tuberkelbakterien eingeführt, bei dem nicht die Zentrifugalkraft, sondern die Affinität der Tuberkelbakterien zu den spezifisch leichten flüssigen höheren Kohlenwasserstoffen zum Auftrieb benutzt wird: das Ligroinverfahren. Die Methode hat ihren Namen erhalten von dem Ligroin, das sich, was Siedepunkt und spezifisches Gewicht angeht, zwei Punkte, die für das Gelingen wesentlich sind, am besten bewährt hat. Ich habe diese Methoden des historischen Interesses wegen angeführt und um zu zeigen, daß das Problem der Anreicherung schon früher viele Köpfe beschäftigt hat. Die Ligroinmethode hat auch in der Veterinärmedizin einige Untersucher beschäftigt, hat sich aber nicht einführen können, weil wir bei dieser Methode mit Verhältnissen rechnen müssen, die von denen der Humanmedizin vollständig abweichen.

Man braucht bloß die massigen Sputa des Menschen mit der winzigen Menge Auswurfstoffe, die wir von den Rindern selbst bei ausgebreiteter Tuberkulose gewinnen können, zu vergleichen, um von vornherein feststellen zu müssen, daß man mit allen diesen Methoden ins Hintertreffen gerät. In gleicher Weise braucht man bloß die Menge der im menschlichen Sputum vorkommenden Tuberkelbakterien der meist geringen Zahl der im Rinderauswurf enthaltenen gegenüberzustellen, um sogleich die ganzen Schwierigkeiten zu ermessen, die die tierärztliche Diagnostik zu beseitigen hatte, um zu solch erfreulichen Ergebnissen trotz allem zu gelangen. Zu diesen Schwierigkeiten gehört auch die Tatsache, daß die Technik der Entnahme von ganz anderen Voraussetzungen ausgehen muß, als in der Humanmedizin und daß Verunreinigungen sekundärer Art das Bild wesentlich ungünstig gestalten, so daß selbst bei ausgebreiteter Tuberkulose sehr wenig und manchmal, auch nach Anreicherung, gar keine Tuberkelbakterien gefunden werden. Hinzu wird kommen, daß die letztgenannte Methode im Großbetriebe, wie er in Wirklichkeit an den Instituten, die sich mit der Durchführung des staatlichen Tuberkulosebekämpfungsverfahrens befassen, vorliegt, viel zu umständlich und damit zu kostspielig ist.

b) Die neueren Methoden.

Während die vorhergehenden Verfahren lediglich in der Humanmedizin geübt wurden und da auch heute nur noch von historischem Wert sind, hat sich das Uhlenhutsche Antiforminverfahren mit bestem Erfolge auch in die Veterinärmedizin eingeführt.

Die Wirkung des Antiformins besteht in der Verflüssigung und Homogenisierung des mit ihm versetzten Untersuchungsmaterials. Diese Wirkung hat es selbst auf feste Kotballen. Die wichtigste Eigenschaft ist aber die, daß es alle Bakterien auflöst, mit Ausnahme der sogenannten „antiforminfesten", zu denen in erster Linie das Tuberkelbakterium zählt. Wegen dieser letzteren Eigenschaft eignet es sich vor allem zur Kotuntersuchung, wie oben bereits angedeutet wurde. v. Ostertag (2) hielt wohl zu Unrecht die Bedeutung des Antiformins für die Diagnostik der offenen Formen der Tuberkulose für sehr gering. Denn nachdem Machens und Kordes (3) neuerdings wieder Nachprüfungen des Antiforminverfahrens vorgenommen haben, machen sie ganz erfreuliche Feststellungen. Machens kam es darauf an, den Bodensatz zu gewinnen und diesen ganz auf den Objektträger zu bringen. Er konstruierte ein Zentrifugierröhrchen nach Art der Trommsdorf'schen, die zur Milch-Eiterprobe benutzt werden. Die Konstruktion der Röhrchen ist in Machens und Tiedings (5) Arbeit genauestens beschrieben, was sich an dieser Stelle erübrigt. Machens verfährt so, daß er das mit Antiformin vorbehandelte Material bei 4000 Umdrehungen in der Minute ¼ Stunde lang zentrifugiert, dann wird die über dem Bodensatze befindliche Flüssigkeit abgegossen und 10 ccm Wasser wieder zugegeben. Jetzt erst wird das gesamte Material ins Machens-Röhrchen gefüllt und 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Bodensatz wird nun dadurch auf den Objektträger gebracht, daß nach Entfernung des unteren Gummistöpsels auf ein im oberen befindliches Glasstäbchen ein leichter Druck ausgeübt wird, wodurch leicht ein Tropfen des Bodensatzes auf das Glas gerät. Es ist ganz verständlich, daß Machens keine eingehenden Angaben macht, da es ihm sicher darauf ankam, die Ueberlegenheit seiner Methode erst einmal zu beweisen und Anregungen zur Nachprüfung zu geben. Machens teilt demnach nur mit, daß er im Laufe von 8 Monaten bei 46 Proben Tuberkelbakterien habe nachweisen können, bei denen die gewöhnliche miskroskopische Untersuchung negativ ausgefallen war. Die Antiforminmethode kam und kommt in der Haupt-

sache auch heute noch für die Untersuchung der Rachenschleimproben in Frage, da diesen gewöhnlich sehr viele säurefeste und sonstige Begleitbakterien anhaften. Im übrigen dürfte ihre Bedeutung mehr und mehr vor den anderen schon aus dem Grunde zurücktreten, weil in den meisten Instituten Rachenschleimproben kaum noch zur Untersuchung gelangen. Der Nachteil des Antiforminverfahrens liegt darin, daß die Tuberkelbakterien zwar färberisch leichter nachweisbar sind, aber bei negativem mikroskopischem Befunde sind die Proben wertlos, weil die in ihnen vorhandenen Tuberkelbakterien, mit denen man auch bei bakterioskopisch negativen Fällen immer noch rechnen muß, zugrunde gegangen sind und die Proben daher für eine Verimpfung nicht mehr verwandt werden können. Diese Schwierigkeit läßt sich aber auch umgehen, und zwar dadurch, daß man einen Teil des noch nicht mit Antiformin versetzten Materials absondert und dieses mit physiologischer Kochsalzlösung verimpft.

Aus diesem Grunde suchten Scharr und Lentz (4) auf einem anderen Wege dem Ziele einer möglichst reichen Ausbeute an Tuberkelbakterien näher zu kommen, ohne dabei die Bakterienleiber selbst zu schädigen. Sie gingen nach folgendem Untersuchungsschema vor:

1. Mikroskopische Untersuchung des Ausstriches der eingesandten Lungenschleimproben ohne irgend welche Vorbehandlung.

2. Mikroskopische Untersuchung der negativen Proben nach der Vorbehandlung nach Machens.

3. Verimpfen der auch nach diesem Verfahren noch negativen Proben an Meerschweinchen.

Schon nach der 13ten Probe änderten sie das Verfahren insofern ab, als sie statt der Machens-Röhrchen einfache Agglutinationsröhrchen, sogenannte A-Röhrchen, benutzten, mit der Begründung, daß diese weniger leicht zerbrechlich und daß das damit gewonnene Zentrifugat genügend wäre. Ferner nahmen sie statt des Antiformins zuerst als Anreicherungsmittel destilliertes Wasser. Die Luftröhrenpinsel wurden in eigens für diesen Zweck hergestelltes Aqua destillata gebracht, dann wurden die so beschickten Reagenzgläschen eine Stunde lang bei 60° im Wasserbade gehalten, kräftig durchgeschüttelt und die gewonnene Abschwemmung in Agglutinationsröhrchen 10 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Bei diesen Versuchen beobachteten die Autoren, daß in denjenigen Proben, die vor oder nach dem Aufenthalte im

Wasserbade gestanden hatten, schneller als sonst Tuberkelbakterien nachzuweisen waren. Diese Beobachtung brachte sie dazu, an eine Vermehrung der Tuberkelbakterien zu denken. Jetzt wurden von zwei verschiedenen Untersuchern unabhängig voneinander 5 Lungenschleimproben, die nach dem oben berichteten Schema behandelt waren, aber nach dem Aufenthalte im Wasserbade 6, 24, 48 Stunden gestanden hatten, untersucht; sie fanden, daß 1) nach der sechsten Stunde auffallend viel gekörnte Tuberkelbakterien vorhanden waren, während sich nach der 24ten Stunde fast nur ausgewachsene Formen vorfinden ... Sie meinten daher, daß die gekörnten Tuberkelbakterien neue Vegetationsformen darstellten. Nach 24 Stunden soll die Vermehrung der Tuberkelbakterien ihren höchsten Grad erreicht haben, während sich nach 48 Stunden erheblich weniger Bakterien im Präparat vorfinden.

Gerade die Auffassung von Scharr und Lentz, daß die Tuberkelbakterien sich im Aqua destillata vermehren sollten, war die Veranlassung, weshalb ich beauftragt wurde, die Frage noch einmal zu prüfen, inwieweit eine Vermehrungsfähigkeit der Tuberkelbakterien in diesem Medium überhaupt in Frage kommen konnte.

Von vornherein erscheint es eigentlich undenkbar, daß schon im destillierten Wasser selbst bei günstigen Temperaturverhältnissen eine Vermehrung überhaupt möglich ist. Man braucht nur zu bedenken, unter welch schwierigen Verhältnissen Tuberkelbakterien sich gerade aus dem Tierkörper züchten lassen und wieviel Kunstgriffe man anwenden muß, um zu einer Reinkultur schnell und sicher zu gelangen, dann erscheint es schon von vorneherein unwahrscheinlich, daß die Auffassung von der Vermehrung der Tuberkelbakterien je Bedeutung erlangen kann. Die Vermehrung der Begleitbakterien wird durch das destillierte Wasser zweifellos behindert und schon aus diesem Grunde schien die Nachprüfung des Verfahrens, das Aqua destillata als Anreicherungsflüssigkeit verwandte, außerordentlich wertvoll.

In den Scharr'schen Versuchen wurde aber bald eine Aenderung insofern vorgenommen, als statt des Wasserbades nun von Scharr und Lentz ein 24stündiger Brutschrankaufenthalt zur Erzielung einer besseren Vermehrungsfähigkeit der Tuberkelbakterien eingeführt wurde. Das destillierte Wasser wurde durch eine 2proz. Glycerinlösung ersetzt. Bei Anwendung dieser neuen Methode wurden bei der Untersuchung von 38 Proben 28 schon mikroskopisch vor Anreicherung als positiv, d. s. 73% und 10 = 27%, nach der Anreiche-

rung gefunden, sodaß also durch den Tierversuch keine neuen positiven Ergebnisse gezeitigt werden konnten.

Aus diesen außerordentlich günstigen Ergebnissen zieht Scharr den Schluß, daß eine Anreicherung auf biologischer Grundlage vorliegen müsse, und zwar kommt er darauf, weil bei seinem Verfahren die positiven Ergebnisse die Zahl der bei der Machen'schen Versuchsanordnung ermittelten ganz bedeutend überstiegen. Dadurch ist er wahrscheinlich einer Selbsttäuschung zum Opfer gefallen, als er von der Annahme ausging, daß, wenn das Antiforminverfahren einen Untergang und damit eine Verminderung der Tuberkelbakterien im Gefolge habe, damit einhergehend die geringe Zahl der positiven Ergebnisse sich zwanglos erklären lassen müßte.

Wenn nun eine derartige größere positive Ausbeute mit seinem Verfahren zu erzielen war, so konnte sie seiner Ansicht nach nur von einer Vermehrung der Tuberkelbakterien herrühren. Der Gedanke, daß seine neue Methode durch ihre bessere Möglichkeit der Einengung der Bakterien dadurch eine höhere Zahl an positiven Funden ergeben könnte, ist ihm erst später gekommen. Insofern sind die Nachprüfungen außerordentlich wertvoll gewesen, als alle Autoren, die sich mit der Scharr'schen Methode, die ohne Zweifel eine wesentliche Bereicherung des diagnotischen Verfahrens darstellt, befaßten, sich darin einig sind, daß es sich nur um eine stärkere Konzentration von Tuberkelbakterien im Untersuchungsmaterial handelte. Schon in der Arbeit von Tieding (5) konnte die Auffassung des Leiters des Bakteriologischen Instituts, Herrn Direktors Dr. Sachweh hinreichend begründet werden, daß die Vermehrung der Tuberkelbakterien bei diesem Anreicherungsverfahren von vorneherein garnicht in Frage kommen konnte, weil die Vermehrung der Begleitbakterien derartig stark sei, daß die Tuberkelbakterien als krankmachende sich dem Nährboden erst anpassende und dadurch von vorneherein geschwächte Bakterien schon durch die Stoffwechselprodukte der Begleitbakterien an ihrer Vermehrung gehemmt werden müßten.

Es konnte in zahlreichen Versuchen des hiesigen Bakteriologischen Instituts nachgewiesen werden, daß sich diese Vermehrung der Begleitbakterien derartig ungünstig auswirkte, daß eine Verimpfung des Materials an Meerschweinchen selbst bei stärkster Verdünnung und vorsichtiger Dosierung stets den Tod der Versuchstiere binnen 24 Stunden an malignem Ödem, oder an Septikämien, die durch andere Bakterien ausgelöst wurden, hervorgerufen wurde. Diese Auffassungen wurden

von Giese und Beller (6) bestätigt; wenn nun Giese die Ansicht vertritt, daß die Zahl der Fehlergebnisse anderer Institute, die sich mit den seinigen nicht decken, zwanglos, um nur ein Beispiel herauszugreifen, sich damit erklären ließen, daß diese Autoren sich nur vorübergehend mit solchen Untersuchungen beschäftigt hätten oder eine andere Untersuchungstechnik als die von Scharr und Lentz eingehaltene befolgt hätten, so ist dem gegenüber zu halten, daß selbstverständlich die Dissertationen nur einen Ausschnitt aus dem Rahmen des Gesamtuntersuchungsbildes geben. Wenn aber in einem Institut, in dem dieses Verfahren fast ausschließlich bearbeitet wird, die Ergebnisse auch nicht besser sind, so dürfte der Hinweis verfehlt sein, daß nur infolge der vorübergehenden Bearbeitung dieser Frage die nicht ausreichende Zahl der positiven Ergebnisse erzielt worden sei. Es dürfte wohl in einem Institut, das sozusagen seine Existenzbedingungen von dieser Diagnose abhängig machen kann, alles Mögliche getan werden, um die Zahl der positiven Fälle auf die allerhöchste Höhe zu bringen und wenn eben die Zahl nicht erreicht wird, so liegt das nicht etwa an der mangelhaften Sauberkeit der Reagenzien und am Ausstreichen und Färben, sondern es liegt eben daran, daß die Methode noch nicht soweit ist, daß sie mit 100%iger Sicherheit die positiven Fälle erfassen kann. Ob es überhaupt jemals dahin kommen wird, ist zweifelhaft, da jede biologische Methode mit einer Reihe von Unzuträglichkeiten von vorneherein rechnen muß. Schon der Zeitpunkt der Probeentnahme ist wichtig für den Erfolg der Feststellung der Tuberkulose; daran ändert die beste Untersuchungstechnik nichts. Durch geschultes nicht überanstrengtes Untersuchungspersonal kann die Zahl der positiven Fälle außerordentlich hoch gebracht werden, wie die Erfahrungen des hiesigen Instituts zeigten. Auch die Zahl der Fehlerquellen kann verringert werden; das wurde bewiesen, als im Jahre 1925 25 mikroskopisch positive Fälle sich bei der Schlachtung als negativ erwiesen, während diese Zahl im Jahre 1926 auf 5 reduziert werden konnte. Es ist aber nicht zu verkennen und das muß immer wieder betont werden, daß der neue Weg der Einengung einen ganz wesentlichen Fortschritt bedeutet, der gerade jetzt, wo unter der Bevölkerung das Verständnis für die Bedeutung der Tuberkulose des Rindviehs zu wachsen beginnt und wo die Anschlüsse sich von Tag zu Tag mehren, von größter Bedeutung ist. Die hier hervorgehobenen Tatsachen waren Scharr zum Teil selbst klar und deshalb legte er besonderen Wert darauf, daß Nachprüfungen seiner Versuche angestellt wurden. Im hiesigen

Bakteriologischen Institut ist deshalb Tieding (5) als erster mit der Nachprüfung betraut worden und er stellte auf Grund der zahlreichen Untersuchungen, die in den Rahmen der laufenden Untersuchungen zwanglos eingereiht wurden, fest, daß, und darauf kam es in erster Linie an, eine Vermehrung der Tuberkelbakterien, die Scharr vermutete, nicht zu beobachten war. Er konnte sogar feststellen, daß in einem Falle eine Probe, die vor der Anreicherung 28 Tuberkelbakterien im Gesichtsfeld erkennen ließ, später nur 5 in derselben Fläche erkennen ließ. Das Gesamtergebnis der Untersuchung faßt er dahin zusammen, daß der neue Untersuchungsvorgang eine Verbesserung der diagnostischen Methode bedeutet, daß ferner eine Vermehrung der Tuberkelbakterien in keinem Falle stattfinde und daß es sich dabei um eine Homogenisierung der Tuberkelbakterien und um eine Einengung der vorher im Material schon vorhandenen Bakterien handele. Er bestreitet ferner eine Ueberlegenheit des Scharr-Verfahrens gegenüber dem Machens-Verfahren.

Dann hat Rautmann (7) mitgeteilt, daß er, ähnlich wie Tieding, eine Ueberlegenheit der Machens-Methode gegenüber der Scharrschen nicht habe nachweisen können. Er findet aber auch nur 82 Prozent der positiven Fälle mikroskopisch heraus im Gegensatz zu den 95 Prozent von Scharr. Er erzielt noch günigere Ergebnisse als Tieding. Im übrigen decken sich auch die Rautmannschen Auffassungen inbezug auf die Bewertung und Bedeutung des Verfahren mit denen der anderen Autoren.

Timphaus (8), der an einem ziemlich umfangreichen Material von 719 Proben die Frage der Bedeutung der Anreicherung geprüft hat, baut seine Untersuchungen auf einem selbstformulierten Fragekomplex auf. Es kommt ihm darauf an, nachzuweisen, ob in 75prozentigem Glycerin unter Zusatz von 2 Prozent Glukose Anreicherung eintritt und wie das Wachstum der Tuberkelbakterien sich in diesem Nährmedien nach 24stündiger, nach 8tägiger und nach 4wöchiger Brütung verhält.

Ferner will Timphaus die Frage prüfen, ob ein Rinderserum-Glyceringemisch verschiedener Konzentration nach verschiedenen Zeiten des Brutschrankaufenthalts Einfluß auf die Vermehrung der Tuberkelbakterien hat, und zuletzt will er prüfen, ob diese Anreicherungsmethoden die altbewährte Antiforminanreicherungsmethode übertreffen.

Ich führe die Arbeit des Interesses wegen an, obwohl sie aus dem gewöhnlichen Rahmen herausfällt, zumal da Scharr

bei seiner Arbeit eine 2prozentige Glycerinlösung mit destilliertem Wasser anwendet. Die Arbeit hat also direkt mit dem Scharrschen Verfahren nichts zu tun, sondern Timphaus stützt sich auf eine Beobachtung, die Schiller (10) in Odessa gemacht haben will, und die bei der Verwendung von 75prozentigem Glycerin als Anreicherungsmedium eine ganz hervorragende Vermehrung der Tuberkelbazillen erzielt haben will. Schiller behauptet ferner, daß die Vermehrung der Tuberkelbazillen in Glycerin lehr gut möglich sei, und daß ferner die Begleitbakterien nicht zur Vermehrung gelangten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen Timphaus sind so, daß er bei Verwendung 15prozentiger Antiforminlösung in 93,98 Prozent der Fälle positive Ergebnisse gefunden hat, und daß er bei der Anreicherung nach Schiller insgesamt durchschnittlich etwas über 40 Prozent positiver Proben fand, ganz gleichgültig, ob die Proben 24 Stunden, 8 Tage oder 4 Wochen im Brutschrank waren. Die ungünstigsten Ergebnisse erzielte er bei Verwendung von 25prozentigem Glycerin und 75prozentigem Rinderserum plus 2 Prozent Glukose. Hier hatte er nur nach 24stündiger Brütung 45 Prozent positive, nach 8 Tagen 30 Prozent positive und nach 4 Wochen 20,3 Prozent. Die Ergebnisse sind also außerordentlich ungünstig und beweisen erneut, daß die Anwendung der in der Humanmedizin üblichen Methoden für tierärztlich-diagnostische Zwecke leider nicht immer in Frage kommen kann. An sich hat schon das Glycerin ein derartig dichtes Medium, daß die Verarbeitung von Proben in dieser speudokollodialen Masse außerordentlich schwer verlaufen muß. Es ist deshalb verständlich, daß Timphaus auf Grund seiner Untersuchungen zu einer Ablehnung der Glycerinanreicherung kommt, und die Antiforminmethode als überlegen bezeichnet.

Knuth (9) stellt zwar eine Verbesserung des mikroskopischen Nachweises fest, will jedoch den Tierversuch nicht ausgeschaltet wissen. Eine Vermehrung von Tuberkelbakterien in der Anreicherungsflüssigkeit hält er für unwahrscheinlich.

Zu ganz merkwürdigen Resultaten kommt Voelkel (11) auf Grund seiner am Bakteriologischen Institut der Landwirtschaftskammer in Kiel angestellten Nachprüfungen. Er findet von den untersuchten Proben 56,5 Prozent mikroskopisch im gewöhnlichen Ausstrich positiv, während 43,5 Prozent erst durch den Tierversuch ermittelt werden konnten. Er betont außerdem, daß er vor und nach der Anreicherung überhaupt keinen Unterschied in der Zahl der Tuberkelbakterien habe feststellen können. In 21,9 Prozent wurden nach der Vorbe-

handlung sogar weniger Tuberkelbakterien ermittelt. Eine Erklärung hierfür ist schwer zu finden; denn die Tatsache, daß die Untersuchungsmethode Voelkels von der der anderen Autoren wesentlich abweicht, kann nicht das ausschlaggebende Moment sein für diese außerordentlich starken Abweichungen. Wenn auch die anderen Autoren, unter ihnen auch Scharr, behaupten, daß die Entnahme und Verarbeitung des Untersuchungsmaterials ausschlaggebend sein sollen, so darf diese Forderung in dieser Form abgelehnt werden, wenn nicht eben ganz grobe Verstöße gegen die einfachsten Methoden der Untersuchungstechnik vorgenommen werden, zumal das Anwachsen der Bakterien während des Brutofenaufenthaltes schon an sich jede Möglichkeit einer sterilen Bearbeitung unterbindet und andererseits gerade infolge dieses Bakterienwachstums, das einmal stark, einmal weniger stark auftritt, je nach der Technik der Probeentnahme und nach anderen unübersehbaren Faktoren schon niemals ein gleichmäßiges Ergebnis erzielt werden kann. Es müssen eben im Falle Voelkel ganz eigenartige Verhältnisse vorgelegen haben, die von hier aus nicht zu übersehen sind, die sich aber in der eigenartigen Anordnung des Ergebnisses bei der Untersuchung der Proben seltsam auswirkten. Wie eigentümlich die Verhältnisse bei der Probeentnahme sind, soll bei einem Fall erklärt werden, der folgendermaßen verlief: Es wurden bei einer Kuh, die mit allen Zeichen der hohen Wahrscheinlichkeit der Lungentuberkulose befallen war, Proben entnommen mit dem Ergebnis, daß weder vor noch nach der Anreicherung Tuberkelbakterien gefunden wurden; dies war so eigentümlich und stand so durchaus im Widerspruch mit dem klinischen Befunde großblasiger Rasselgeräusche beider Lungenflügel, daß zwei Tage später nochmals eine Probeentnahme veranlaßt wurde, die nunmehr sofort mikroskopisch den Nachweis zahlreicher Tuberkelbakterien im Ausstrich erkennen ließ.

In einer Reihe anderer vom Institut beobachteter Fälle konnte festgestellt werden, daß die erste Probeentnahme bei einem Tier mit allen klinischen Erscheinungen der Lungentuberkulose vor und nach der Anreicherung negativ inbezug auf das mikroskopische Ergebnis verlief; daraufhin wurde die Probe verimpft; mittlerweile hatte sich der Zustand des Tieres innerhalb der nächsten 14 Tage derart verschlechtert, daß das Ergebnis des Impfversuches nicht abgewartet werden konnte und nochmals eine Lungenschleimprobe angefordert wurde mit dem Ergebnis, daß jetzt massenhaft Tuberkelbakterien u. A. schon vor der Anreicherung gefunden wurden. Das

allermerkwürdigste geschah nun aber insofern, als der Meerschweinchenversuch, dessen Ergebnis nach 8 Wochen, wie es im Bakteriologischen Institut üblich ist, abgelesen wurde, ebenfalls vollständig negativ ausfiel, obwohl auch diese Proben von dem Tier entnommen wurde zu einer Zeit, als es sicher schon offen tuberkulös war. Es erhellt daraus, daß eine große Menge nicht vorhergesehener Ereignisse auftreten kann, die das Ergebnis des Versuches in außerordentlich mannigfaltiger Weise beeinflussen können. Die in Frage kommenden Tiere erwiesen sich bei der Schlachtung als mit offener Lungentuberkulose behaftet.

Vornehmlich obenan steht jedenfalls nicht die Technik der Entnahme als störender Faktor, sondern der Zeitpunkt der Probeentnahme ist allein ausschlaggebend für das Ergebnis der Untersuchung vor und nach der Anreicherung, vorausgesetzt natürlich bei offener Lungentuberkulose. Es kann jedenfalls gesagt werden, daß, wenn auch die Ansichten über das neue Einengungsverfahren hier und da noch einige kleine Unterschiede in der Bewertung aufweisen, doch alle Fachleute darin einig sind, daß diese Methode von ausschlaggebender Bedeutung für die Tuberkulose-Diagnostik geworden ist. Man kann auch heute noch der Ansicht sein, daß eine Vermehrung der Tuberkelbakterien nicht eintritt, trotzdem wäre es verkehrt, wollte man diese Methode ablehnen. Im Gegenteil, es kommt darauf an, so viel herauszuholen wie möglich ist, und wenn auch das Ergebnis der positiven Fälle niemals ein 100prozentiges sein kann, so wird man zweifellos dahin kommen, es der Hundertzahl m. o. w. zu nähern.

Eigene Versuche über das Einengungsverfahren mit destilliertem Wasser.

Die Hauptlandwirtschaftskammer (Mitteilung an die Kammerinstitute) ist der Ansicht gewesen, daß mit Rücksicht auf die zahlreichen Arbeiten, eine weitere Prüfung nicht mehr erforderlich sei. Das mag an sich richtig sein. Die jährlichen Untersuchungsergebnisse in den einzelnen Instituten werden ja im Laufe der Jahre ein ganz klares Bild über die Bedeutung der Methode an sich und über die der Abänderungen des Verfahrens inbezug auf die Zahl der positiven Fälle feststellen lassen. Es sollte aber im Institute trotzdem nochmals versucht werden den Nachweis zu erbringen, inwieweit eine sogenannte Anreicherung durch Kochsalz erzielt werden kann.

Deshalb wurde mir die Aufgabe zuteil, diese Frage zuerst in den Bereich meiner Beobachtungen zu ziehen und als die Ergebnisse außerordentlich schlecht ausfielen, wurde mit destilliertem Wasser gearbeitet. Zweifellos mußte diese Methode von vornherein vorteilhafter sein, als der dreiwertige Alkohol des Glycerins, der immer nur die Bedeutung eines Nährmediums für Begleitbakterien darstellt. Wenn auch zugegeben werden muß, daß der Schleim und weiße Blutkörperchen als Eiweiß immerhin einen Nährboden darstellen und dadurch auch bei Zusatz von Aqua destillata in gewissem Sinne immer noch die Vermehrung von Bakterien hier und da stattfindet, so muß dieser Faktor gegenüber der Vermehrung der Bakterien in der Glycerinflüssigkeit doch ganz wesentlich an Bedeutung zurücktreten.

Es kam mir von vornherein darauf an, den Nachweis zu führen, daß eine Vermehrung der Tuberkelbakterien nicht in Frage kam. Das beweist ja auch schon das außerordentlich günstige Ergebnis der Antiforminmethode Timphaus, denn in den 93 Prozent der positiven Fälle konnte bei der Verwendung von Antiformin eine Vermehrung der Tuberkelbakterien überhaupt nicht in Frage kommen.

Die von Giese angegebene Methode, durch Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung eine sog. Anreicherung durch Einengung der Tuberkelbakterien herbeizuführen, erwies sich als wenig befriedigend, da der Ausstrich einen braun-rötlich gefärbten zusammenhängenden lackähnlichen Ueberzeug auf dem Objektträger darstellte, der an sich schon mikroskopisch ein ungünstiges Aussehen darbot. Jedenfalls waren die Ausstriche so dick, daß die Untersuchung und die Erkennung der Tuberkelbakterien außerordentlich erschwert war. Nachdem ich eine Reihe Proben untersucht hatte, die in dieser Weise verarbeitet waren, wurde mir der Auftrag zuteil, mit dieser Methode nicht fortzufahren und mit destilliertem Wasser zu arbeiten. Es kam hinzu, daß durch die physiologische Kochsalzlösung die roten Blutkörperchen nicht gelöst wurden, sodaß sie nachher in Form eines dicken zusammenhängenden Konglomerates den Ausstrich außerordentlich unübersichtlich gestalteten. Diese Unannehmlichkeit wurde bei der Verwendung von destilliertem Wasser sofort ausgeschaltet und deshalb wurde nach dieser Methode an 217 Proben das erforderliche für die Beurteilung der Methode wichtige Material gewonnen. Die Proben wurden so verarbeitet, wie sie sich im Laufe der Untersuchung einfanden. Und zwar wird zunächst von sämtlichen zur Untersuchung

gelangenden Proben ein Deckglas Ausstrich gemacht und derselbe nach der Spengler'schen Färbemethode behandelt. Die Luftröhrenpinsel werden abgeschnitten und in einfache Spitzröhrchen gebracht; dann werden sie mit 4,5 ccm frischem, eigens zu diesem Zweck hergestellten destillierten Wasser versetzt. Jetzt werden die Röhrchen im Wechselmannschen Apparat gründlich durchgeschüttelt und 12 Stunden im Brutschrank bei 38 ° gehalten. Nach diesem Aufenthalte werden die Gazebäuschchen mit einer sterilen Pinzette ausgequetscht und eine viertel Stunde bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert; jetzt wird die oben stehende Flüssigkeit abgegossen und der Bodensatz möglichst ganz auf den Objektträger gebracht und nach Spengler gefärbt. Die auf der Bongert'schen Kupferbank gut lufttrocken gemachten Präparate wurden in Methylalkohol fixiert, sodann mit Karbolfuchsin überschüttet und nach dreimaligem Aufkochen abgespült und in 3prozentigen salzsauren Alkohol gebracht, in dem sie längere Zeit — eine halbe Stunde etwa — verharrten. Die gut abgespülten Präparate kamen nun in eine gesättigte Prikrinsäurelösung für 1 Minute und wurden, wenn sie lufttrocken waren, mit 800facher Vergrößerung untersucht.

Das Ergebnis der Versuche ist in folgender Tabelle enthalten:

Vor der Einengung		Nach der Einengung	
Zahl der untersuchten Präparate	Zahl der in jedem derselben gefundenen Tb. Bakterien	Zahl der untersuchten Präparate	Zahl der in jedem derselben enthaltenen Tb. Bakterien
162	–	5	weniger als 10
6	1	42	10 – 20
5	2	37	20 – 30
7	3	13	30 – 40
3	4	10	40 – 50
9	5	13	50 und mehr
5	6	97	
1	7	217	
3	8		
5	10		
11	10 – 36		
217			

Insgesamt sind 217 Proben im Laufe des täglichen Turnus untersucht worden. Dabei hat sich herausgestellt, daß

55 Proben = rund 20 Prozent vor Einengung positiv waren,
67 „ = 30 Prozent erst nach Einengung positiv waren, von den übrigen

95 von und nach Anreicherung negativen Proben waren nach der Impfung 38 Prozent positiv und 12 Prozent blieben negativ. Das Ergebnis erhellt aus der beigefügten Tabelle.

Es zeigt sich beim Vergleich mit der Tiedingschen Arbeit (5), daß das Ergebnis im wesentlichen, in Bezug auf die Ausbeute an positiven Proben nach der Anreicherung sich günstiger gestaltet hat. Das war wohl vorauszusehen.

Während Tieding nach der Einengung nur in 17,5 Prozent der Proben ein positives Ergebnis fand, hat sich in meinen Versuchen diese Zahl mit 30 Prozent der nach der Einengung positiven Proben günstiger gestaltet. Ich habe eine Mehrausbeute von rund 13 Prozent erhalten. Das günstigere Ergebnis der vor und nach der Impfung negativen Proben im Verhältnis zu dem Ergebnis der Tiedingschen Untersuchung geht bei mir auf Kosten der größeren positiven Ausbeute nach der Impfung.

Es läßt sich aber ohne weiteres sagen, und darin liegt der Zweck und eine gewisse Berechtigung zu dieser Arbeit, daß eine Vermehrung der Tuberkelbakterien nicht eingetreten ist, sondern daß, wie schon immer wieder betont wurde, lediglich der verbesserten Technik die größere Mehrausbeute an positiven Proben nach der Anreicherung zu verdanken ist. Es läßt sich nun wohl sagen, daß weder im Glycerinwasser noch im Glycerin-Rinderserum eine Vermehrung überhaupt eingetreten ist, denn wenn dies eingetreten wäre, dann hätte Tiedings Ausbeute an positiven Proben nach der Einengung jedenfalls mindestens sich auf der Höhe der meinen halten müssen, so ist sie aber noch von mir übertroffen und es wird im Ernst niemand behaupten wollen, daß im destillierten Wasser eine Vermehrung der für eine subtile Züchtigungsmethode außerordentlich empfindlichen Tuberkelbazillen erfolgen kann.

Deshalb dürfte es auch zweckmäßig sein, den Vorzug bei der Anwendung der Methode ganz allein der Technik der Verarbeitung, und Untersuchung des Materials zuzuerkennen, und statt von einer Anreicherungsmethode von einer Einengungsmethode zu sprechen. Denn man weist nur die von vornherein vorhandenen Tuberkelbazillen nach.

Diese Methode der Anwendung des destillierten Wassers hat gegenüber der Glycerinmethode den Vorzug, daß sie absolut klare Bilder gibt, da einmal die Vermehrung der Begleitbakterien wesentlich eingeschränkt wird und gegenüber der unangenehm sich bemerkbar machenden Vermehrung im Glycerinwasser kaum in die Erscheinung tritt.

Daraus ergibt sich, daß in der Anwendung des destillierten Wassers ein unleugbarer technischer Vorteil liegt; denn man ist nicht wie bisher gezwungen, von vornherein Material für die Verimpfung beiseite zu stellen; denn das Bodensatzmaterial läßt sich ohne besondere Schwierigkeiten auch nach dem Brutschrankaufenthalt glatt verimpfen, was bisher niemals möglich war.

Am Schluß meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht Herrn Dr. Sachweh, Direktor des Bakteriologischen Institutes der Landwirtschaftskammer, sowohl für die Ueberlassung des Themas und für das wohlwollende Interesse, das er der Arbeit selbst entgegenbrachte, als auch für die mancherlei Anregungen sonstiger Art, die ich aus seinem Institute mitgenommen habe, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich wurde am 28. 5. 03 als Sohn des Hegemeisters Heinrich Stiens zu Nordkirchen i. W. geboren. Daselbst besuchte ich bis zu meinem dreizehnten Lebensjahre die Elementarschule. Meine Gymnasialstudien erledigte ich auf dem humanistischen Gymnasium Gaesdonck und beschloß dieselben mit der Reifeprüfung im Frühjahr 1922. Ich wandte mich dem tierärztlichen Studium zu und verbrachte das erste Semester in München. Die übrigen Semester studierte ich an der Tierärztlichen Hochschule zu Hannover, wo ich Frühjahr 1924 meine veterinärmedizinische Vorprüfung bestand. Meine Approbation als Tierarzt erlangte ich Herbst 1926.

Literaturverzeichnis.

1. Eisenberg: Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abt. 1, Orig. 8 1918.

2. v. Ostertag: Die Bekämpfung der Tuberkulose des Rindes 1913.

3. Machens: Zur Verbesserung des Antiforminverfahrens beim Nachweis von Tuberkelbakterien D. T. W. 1921 S. 15.

4. Scharr u. Lentz: Weitere Forschungsergebnisse auf dem Gebiete der Feststellung der offenen Lungentuberkulose beim Rinde D. T. W. 1924.

5. Tieding: Untersuchungen über den Nachweis von Tuberkelbazillen durch die Anreicherungsverfahren von Scharr und Machens. (Inaugural-Dissertation Gießen 1925).

6. Giese u. Beller: Ueber den Nachweis von Tuberkelbazillen im Lungenschleim des Rindes. (Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde 1927 Seite 333—348).

7. Rautmann: Deutsche tierärztliche Wochenschrift 1925 Seite 393.

8. Timphaus: Untersuchungen über die Anreicherung von Tuberkelbakterien im Sputum der Rinder mit 75 Prozent Glycerin und 2 Prozent Glukose und Glycerin-Serumgemischen (angeführt nach 6).

9. Knuth: Jahresbericht des Instituts für Tierhygiene der preuß. landw. Versuchs- und Forschungsanstalten zu Landsberg a. d. Warthe 1925/26 (angeführt nach 6).

10. Schiller Odessa: Vorversuche zur Züchtung der Tuberkelbazillen und säurefesten Saprophyten im Auswurfe.

11. Voelkel: Berliner tierärztliche Wochenschrift 26, Seite 281.

Jochmann, Biedert, Lange und Nitsche, Nebel, Stroschein, Spengler, Nemser, Uhlenkuth sind angeführt nach 2) von Ostertag: Die Bekämpfung der Tuberkulose des Rindviehs 1913.